

Electromagnetic Tools for Controlling Biological Systems

Doctoral Thesis

Author(s):

Kim, Taeuk

Publication date:

2015

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010470376>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 22677

Electromagnetic Tools for Controlling Biological Systems

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Taeuk Kim

Master of Science,
Korea Advanced Institute of Science and Technology

born on 04.12.1981
citizen of South Korea

accepted on the recommendations of

Prof. Dr. Martin Fussenegger, examiner

Prof. Dr. Sven Panke, co-examiner

Prof. Dr. Daniel Müller, co-examiner

2015

Summary

Synthetic biology is defined as an engineering discipline that designs genetic and molecular circuits to program cellular behavior in a predictable manner. Magnetic forces and light have the potential to control biological systems with high spatiotemporal precision, which is an attractive characteristic for synthetic biology. Synthetic biology-inspired engineering of magnetically or optically controllable circuits in living cells will pave the way to medical applications such as magnetic labeling of target cell populations or optogenetic control of pathophysiological symptoms. As a stepping stone, here we have designed novel genetic programs to introduce paramagnetic behaviour and light-controlled cGMP-regulated modules to mammalian cells.

Genetically programmable paramagnetic behavior of mammalian cells is described in chapter 1. The combination of ectopic production of the human ferritin heavy chain 1 (hFTH1) for iron storage and the divalent metal ion transferase 1 (DMT1) for iron transport, and the design of an iron-loading culture medium to maximize cellular iron uptake enabled efficient iron mineralization into intracellular ferritin particles and conferred paramagnetic behavior to the entire cell. The engineered cells could be separated from complex cell mixtures using standard magnetic cell separation equipment.

A novel cGMP-regulated synthetic transcriptional regulatory module is described in chapter 2, which was an essential part of a novel light-controlled transcriptional regulatory module that is described in chapter 3. The cGMP-specific transactivator (GTA)

was created by fusing the bacterial cGMP receptor protein to the VP16 transactivation domain. The corresponding chimeric promoter was designed by fusing the minimal cytomegalovirus immediate early promoter to the GTA-specific operator site. Intracellular cGMP levels were modulated by the guanylate cyclase agonist (B-type natriuretic peptide) and cGMP-hydrolysing phosphodiesterase inhibitors (PDE 3A; cilostazol, milirone, enoximone, PDE A; sildenafil, vardenafil, tadalafil, PDE 9A; BAY 73-6691), and could be successfully monitored with the GTA biosensor.

In chapter 3, a bacterial light-activated guanylate cyclase was engineered by site-directed mutagenesis as a building block for optogenetic circuits. The combination of the designer cyclase and the GTA module enabled light-responsive transgene expression in mammalian cells. Furthermore, a designed optogenetic circuit that was integrated into the penile erectile pathway enabled the blue light-dependent control of the erectile responses in the rat penile *corpus cavernosa*, which represents a novel proof-of-concept of erectile dysfunction treatment.

Zusammenfassung

Die synthetische Biologie ist definiert als eine interdisziplinäre Ingenieurwissenschaft, die sich mit dem Design genetischer und molekularer Schaltkreise beschäftigt, mit deren Hilfe Zellverhalten in einer vorhersehbarer Weise programmiert werden können. Magnetische Kräfte und Licht haben das Potenzial, biologischen Systeme mit hoher Raum-Zeit-Präzision zu kontrollieren, was ein attraktives Merkmal für die synthetische Biologie darstellt. Das Konstruieren von magnetisch oder optisch steuerbaren Schaltungen in lebenden Zellen, inspiriert durch die synthetische Biologie, ermöglicht neue Wege für medizinische Anwendungen, sowie die magnetische Markierung von Zielzellpopulationen oder optogenetische Kontrolle von pathophysiologischen Symptomen. Als Trittbrett hierfür haben wir neue genetische Programme entwickelt, um paramagnetisches Verhalten und lichtgesteuerte, cGMP-regulierte Module in Säugerzellen einzuführen.

Genetisch programmierbares paramagnetisches Verhalten von Säugerzellen wird in Kapitel 1 beschrieben. Die Kombination aus ektopischer Proteinproduktion der menschlichen schweren Ketten 1 des Ferritins für die Speicherung von Eisen und des Enzyms „divalent metal ion Transferase 1 (DMT1)“ für den Eisentransport, zusammen mit dem Design eines mit Eisen beladenen Zellkulturmediums, um zelluläre Eisenaufnahme zu maximieren, ermöglicht eine effiziente Eisenmineralisierung in intrazellulären Eisenpartikeln und überträgt paramagnetisches Verhalten auf die gesamte Zelle. Die so gentechnisch

veränderten Zellen können mit Hilfe von Standard-Magnetzellseparationsgeräten aus komplexen Zellgemischen getrennt werden.

Ein neuartiges synthetisches Transkriptionsregulationsmodul, reguliert durch cGMP wird in Kapitel 2 beschrieben, welches einen wesentlichen Teil eines lichtgesteuerten Transkriptionsregulationsmodul ausmacht, welches wiederum ausführlich in Kapitel 3 aufgeführt wird. Der cGMP-spezifische Transaktivator (GTA) ist ein Fusionsprotein, das aus dem bakteriellen cGMP-Rezeptor und der sogenannten VP16-Transaktivierungsdomäne besteht. Der entsprechend chimäre Promotor wurde durch Fusion des sogenannten „minimal Cytomegalovirus Immediate-Early-Promotor“ mit der GTA-spezifischen Operatorstelle konzipiert. Der intrazelluläre cGMP-Spiegel wurde durch den Guanylatzyklase-Agonisten (B-type natriuretic peptide) und die cGMP-hydrolysierende Phosphodiesterase-Inhibitoren (PDE 3A; cilostazol, milirone, enoximone, PDE A; sildenafil, vardenafil, tadalafil, PDE 9A; BAY 73-6691) moduliert und weiterhin erfolgreich mit dem GTA-Biosensor nachgewiesen werden.

Kapitel 3 beschreibt die Entwicklung einer bakteriellen Guanylatcyclase, die durch Licht aktiviert werden kann. Diese wurde durch gezielte Mutagenese konstruiert und fungiert als Baustein für optogenetische Schaltungen. Durch die Kombination dieser speziellen Cyclase und des GTA-Moduls konnte die transgene Genexpression in Säugerzellen durch Licht ermöglicht werden. Desweiteren wurde eine optogenetische Schaltung entworfen, die in den erektilen Teil des Penis von Ratten integriert wurde. Dadurch konnte eine erektile Reaktion im *Corpus Cavernosum* von Ratten mit Hilfe von Blaulicht induziert werden. Dies stellt den ersten Machbarkeitsnachweis zur Behandlung erektiler Dysfunktion dar.